

RECEIVED

OCT 04 1999

Practitioner's Docket No. TECH CENTER 1600/2900  
48194 (342)

PATENT

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: M. Fujino

Group No.: 1614

Application No.: 09 / 257,650

Filed: February 25, 1999

Examiner: Not Assigned

For: USE AND SCREENING METHOD FOR AN ABERRANT GENE PRODUCT-OPERATING SUBSTANCE

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

## TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPY

Attached please find the certified copy of the foreign application from which priority is claimed for this case:

Country: Japan

Application Number: 9-083758

Filing Date: April 2, 1997

**WARNING:** "When a document that is required by statute to be certified must be filed, a copy, including a photocopy or facsimile transmission of the certification is not acceptable." 37 C.F.R. § 1.4(f) (emphasis added).

SIGNATURE OF PRACTITIONER

Robert L. Buchanan

(type or print name of practitioner)

DIKE, BRONSTEIN, ROBERTS &amp; CUSHMAN, LLP

P.O. Address

130 Water Street, Boston, MA 02109

**NOTE:** The claim to priority need be in no special form and may be made by the attorney or agent, if the foreign application is referred to in the oath or declaration, as required by § 1.63.

## CERTIFICATE OF MAILING (37 C.F.R. § 1.8a)

I hereby certify that this correspondence is, on the date shown below is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Signature

Patricia A. Barnes

(type or print name of person certifying)

Date: 09/24/99

(Transmittal of Certified Copy [5-4])

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1 9 9 7 年 4 月 2 日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 9 年特許願第 0 8 3 7 5 8 号

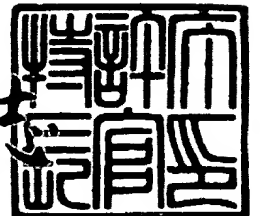
出 願 人  
Applicant (s):

武田薬品工業株式会社

1 9 9 9 年 8 月 1 6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平 1 1 - 3 0 5 7 0 3 7

【書類名】 特許願

【整理番号】 A97061

【提出日】 平成 9年 4月 2日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 35/00

【発明の名称】 異常遺伝子産物作動物質の用途およびスクリーニング方法

【請求項の数】 26

【発明者】

    【住所又は居所】 兵庫県宝塚市雲雀丘2丁目10番7号

    【氏名】 藤野 政彦

【特許出願人】

    【識別番号】 000002934

    【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

    【代表者】 武田 國男

【代理人】

    【識別番号】 100073955

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

    【識別番号】 100077012

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 岩谷 龍

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 005142

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000052

【包括委任状番号】 9000053

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】異常遺伝子産物作動物質の用途およびスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】異常遺伝子産物作動物質を含有してなる、該産物に起因する疾患の予防・治療剤。

【請求項2】異常遺伝子産物が、異常受容体、異常チャンネル、異常トランスポーターまたは異常酵素である請求項1記載の予防・治療剤。

【請求項3】異常受容体作動物質を含有してなる、異常受容体に起因する疾患の予防・治療剤である請求項1記載の予防・治療剤。

【請求項4】異常受容体に起因する疾患が、異常受容体を有する細胞の伝達系が実質的に低下することに起因する疾患である請求項3記載の予防・治療剤。

【請求項5】異常受容体に起因する疾患が、異常受容体を有する細胞の伝達系を天然リガンドが実質的に作動しないことに起因する疾患である請求項3記載の予防・治療剤。

【請求項6】異常受容体に起因する疾患が、天然リガンドの異常受容体に対する親和性が実質的に低下することに起因する疾患である請求項3記載の予防・治療剤。

【請求項7】伝達系が、天然リガンドと受容体との結合により生じる応答物質の細胞内濃度変化に基づく伝達系である請求項5記載の予防・治療剤。

【請求項8】応答物質がcAMP、イノシトールリン酸またはカルシウムイオンである請求項7記載の予防・治療剤。

【請求項9】異常受容体作動物質が、正常受容体を作動する物質である請求項3記載の予防・治療剤。

【請求項10】異常受容体作動物質が、正常受容体を作動しない物質である請求項3記載の予防・治療剤。

【請求項11】異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための、該産物作動物質の用途。

【請求項12】異常遺伝子産物が、異常受容体である請求項10記載の用途。

【請求項13】異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング方法。

【請求項14】異常遺伝子産物が、異常受容体である請求項13記載のスクリーニング方法。

【請求項15】異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための物質のスクリーニング方法。

【請求項16】異常受容体と被検物質とを接触させ、異常受容体に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の異常受容体を有する細胞の伝達系を実質的に作動させるための薬物のスクリーニング方法。

【請求項17】異常受容体が、異常受容体をコードする遺伝子を細胞で発現させることにより調製された異常受容体である請求項15記載のスクリーニング方法。

【請求項18】異常受容体をコードする遺伝子が、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の細胞から調製された遺伝子と、異常受容体を保持しない同種の哺乳動物の細胞から調製された遺伝子とを比較解析することにより特定された異常受容体をコードする遺伝子である請求項17記載のスクリーニング方法。

【請求項19】異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定し、異常遺伝子産物を実質的に作動すると判定される薬物を調製することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための薬物を調製する方法。

【請求項20】異常受容体と被検物質とを接触させ、異常受容体に対する該物質の作動性を検定し、異常受容体を有する細胞の伝達系を実質的に作動すると判定される物質を調製することを特徴とする、異常受容体に起因する疾患の治療のための物質を調製する方法。

【請求項21】異常受容体が、異常受容体をコードする遺伝子を細胞で発現させることにより調製された異常受容体である請求項20記載の方法。

【請求項22】異常受容体をコードする遺伝子が、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の細胞から調製された遺伝子と、異常受容体を保持しない同種の哺乳動物の細胞から調製された遺伝子とを比較解析することにより特定された異常受容体をコードする遺伝子である請求項21記載の方法。

【請求項23】異常遺伝子産物をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物に起因する疾患の治療のための物質をスクリーニングするための用途。

【請求項24】異常遺伝子産物が、異常受容体である請求項23記載の用途。

【請求項25】異常遺伝子産物をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物作動物質をスクリーニングするための用途。

【請求項26】異常遺伝子産物が、異常受容体である請求項25記載の用途。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は異常遺伝子産物作動物質の用途およびスクリーニング方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒト疾患に関連する構造遺伝子の解析から得られる情報、例えば遺伝子変異と疾患との因果関係を解明する情報などを用いて、従来とは全く異なるアプローチ、即ち「疾患原因からの創薬アプローチ」をはじめて可能にさせる新規創薬技術に関し、また、このような新規医薬品創製法に基づき調製される異常遺伝子産物作動物質の用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来の創薬技術は、主として疾患の病態メカニズムを研究し、作用機序から新薬開発の可能性を検討するものであった。この病態メカニズムとは、病態発症の結果であり、その原因ではなかった。そのため、スクリーニング系から得られたリード化合物も、その後期待したほどの臨床効果が得られなかったり、予想外の毒性が臨床で発現することなどにより、開発が中断されることがしばしばあった

。一方、自然科学分野の新技术として、1990年以降ゲノム研究が注目されている。これは広く生物・医学全般にかかわる遺伝子情報の解析研究であり、このゲノム研究により得られる膨大な遺伝子情報は、遺伝子変異と疾病との因果関係を解明する糸口を提供し、「疾患発症の原因からの創薬法」を可能にすると期待されているためである。

遺伝子情報に由来し、疾病発症原因に作用する薬剤の開発は、次のステップで進められる。すなわち、

- ・ 疾病関連遺伝子の配列と機能の同定
- ・ 疾病発症原因遺伝子の決定、遺伝子情報の機能解析
- ・ 疾病発症原因遺伝子情報に由来する候補薬物の選出

という新しい理論的創薬アプローチである。

現在、ゲノムプロジェクトに関連した遺伝子情報に由来した創薬アプローチは、まだ最も初期の段階、「疾病関連遺伝子の配列と機能の同定」のステップにあり、疾病と遺伝子異常の関係を解明する努力が世界中で行われている。

#### 【0003】

アルツハイマー病、高血圧症では、いくつかの疾患関連遺伝子が報告されているが、さまざまな危険因子の解明が待たれ、全容解明にはまだかなりの時間を要する。肥満では、病態発症原因の解明に近づいており、近い将来に抗肥満薬が開発される可能性は高い。インスリン非依存型糖尿病では、近い時期に糖尿病の発症因子が遺伝子レベルで明らかにされるであろう。心臓疾患では、心筋梗塞に関する遺伝子発見などがあり、新しい作用機作を持つ薬剤が近い将来見いだされる可能性は高い。ガンでは、疾病の原因または危険因子の遺伝子発見の努力は、着実に成果を挙げている。しかし、種々のガンは多様性に富み、それぞれの発症原因の全体像が明らかになるには、まだ多くの知見が必要であるのも現実である。

#### 【0004】

アルツハイマー病（AD）のほとんどの症例は、遺伝性のはっきりしない孤発例である。しかしながら、少数の常染色体優性遺伝を示す家族性のAD（familial Alzheimer's disease: FAD）例が存在する。このFADの病因遺伝子が明らかにされれば、孤発性のADの病態の解明、さらにその先にある治療薬の開発に結びつくと



考えられ、近年FAD遺伝子に関する研究が活発に行われている。そうした結果、現在までのところ、早期発症型FADの多くの家系では第14染色体が強く連鎖しており、少数の家系では第21染色体に存在する $\beta$ アミロイド前駆体タンパク質遺伝子に異常のあることが解明された。

これに対して、アルツハイマー病の大多数を占める弧発性アルツハイマー病、あるいは家族性の晩期発症型アルツハイマー病については、最近まで分子遺伝学的な病因は明らかにはされていなかった。しかし、近年これらの疾病は、複数の遺伝学的なリスクファクターが関与する多因子遺伝病ではないかとの立場からの研究が注目を集めている。1993年Corderらによって、アポリポタンパク質E遺伝子多型の一つであるAPOE4が、アルツハイマー病の遺伝的な危険因子として報告された(*Science*, 261, p921, 1993)。彼らは多数のアルツハイマー病患者のAPOEの解析をおこない、これらのタンパク質の遺伝子多型のうちAPOE4が遺伝学的なリスクファクターであると指摘した。彼らの報告によると、家族性の遅発型アルツハイマー病患者群ではAPOE4の頻度が健常者群と比較して、有意に高い。また、アルツハイマー病群をAPOE4を持たない群、APOE4をヘテロ接合体で持つ群、APOE4をホモ接合体で持つ群の3群に分けると、APOE4をより多く持つ群で発症年齢がより若年化していることが明らかにされた。

また、APOE4以外の危険因子として、アポリポタンパク質EのレセプターであるVLDLレセプターの遺伝子多型についても積極的な研究が進められている。

#### 【0005】

肥満に関しては、最近obタンパク質が同定され(*Nature*, 372, p425, 1994)、肥満すると脂肪細胞でのobタンパク質の発現や分泌が亢進し、それが視床下部の満腹中枢を刺激して摂食の抑制、エネルギー消費を抑えるというネガティブフィードバック回路が存在することが判明した。現在ob/obマウスと呼ばれる遺伝性の肥満モデルマウスによる研究が精力的に進められており、このobタンパク質(レプチン、Leptin)がヒトの肥満にどれだけ関与しているのか研究されている。さらに、肥満と $\beta$ 3アドレナリンレセプターの関係も注目を集めている。即ち、肥満はエネルギー摂取の過剰とともにエネルギー消費の低下によっても生じる。

ラット、マウスだけでなくヒトでも、過食や肥満によって交感神経系の $\beta 3$ レセプターの活性が刺激され、特に褐色脂肪細胞などでのエネルギー消費が増大し、熱産生を起こす可能性があると考えられている。この経路は肥満の進行を抑制するフィードバックメカニズムとも捉えられる。そのため、 $\beta 3$ レセプターに先天的な異常があってこのようなフィードバックルートが働かない場合には、肥満あるいは過食によってもエネルギー消費が亢進せず、肥満が助長される結果になる。実際、 $\beta 3$ アドレナリンレセプターの64番目のTrp残基がArg残基に変わっているという変異がピマインディアンと呼ばれる肥満と糖尿病の多発する民族で報告されている[N. Engl. J. Med., 333, 343, (1995)]。さらに、フィンランド人、白人でも同じ変異が同定されている。この変異はこれまで知られている糖尿病における遺伝子変異（インスリン、インスリンレセプター、グルコキナーゼ、ミトコンドリアの各遺伝子変異）と異なり、大変高頻度で、白人で約8%、ピマインディアンで31%にこの遺伝子変異が観察されている。このように、肥満は単なる習慣、文化の問題であるといった概念から、遺伝子レベルに起因して起こる疾病であるといった認識が形成されてきた。

#### 【0006】

インスリン非依存型糖尿病(NIDDM)については、遺伝因子と環境因子の相互作用によって発症することが知られている。そしてこの遺伝因子は必ずしも単一の遺伝子ではなく、複数の遺伝子が発症に関係している多因子遺伝によるものである。現状では、まだ遺伝因子の実態は明らかではないが、いくつかの候補遺伝子の存在が知られている。こうした糖尿病発症のリスクファクターを解明し、糖尿病の早期診断、早期治療、さらに発症予防につなげていくことができれば、糖尿病が重症化し、合併症を併発した時に要する医療費を削減することにもつながり、医療経済的な立場からも大いに望まれることになる。

NIDDMに深く関与している候補遺伝子として考えられているのは、インスリン分泌の異常を起こす遺伝子、インスリン抵抗性を起こす遺伝子などが考えられる。この中でインスリン分泌に関与する遺伝子としては、インスリングルコキナーゼ、ミトコンドリアの遺伝子異常などがある。そして、骨格筋、肝臓のインスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）に関与する遺伝子としては、インスリンレ

セプター、肝臓における糖取り込みに関与するグルコキナーゼの遺伝子異常などが同定されてきている。

グルコキナーゼの異常と、MODY (Maturity-Onset Diabetes in the Young) 症の因果関係については詳細な研究がおこなわれている。グルコキナーゼは膵臓B細胞および肝臓でのブドウ糖代謝の律速酵素で、1つの遺伝子異常によってインスリンの分泌異常とインスリン抵抗性というNIDDMの病態を説明することができる大変興味深い候補遺伝子である。MODYは常染色体優性遺伝を示す25歳未満で発症するNIDDMの早期発症のサブタイプであり、グルコキナーゼの突然変異が認められ、これが原因であると結論されている。

また、これとは別に、インスリンレセプターの異常とNIDDMの関係についても研究が進められている。インスリンレセプターは全部で1355のアミノ酸残基から構成されており、その点突然変異がインスリン抵抗症を発症する原因になっていることが判明している。インスリンレセプター異常の場合はヘテロ接合体でも表現系として現れ、また、ホモ接合体になるともう少し強い表現系が現れてくる、co-dominant (共優性) という遺伝形式をとる。

これら以外にもミトコンドリア遺伝子異常とNIDDMの関連性についても研究がおこなわれているが、これら3つの遺伝子異常はそれぞれ単一の遺伝子異常により糖尿病の特別なサブタイプを引き起こすという意味での糖尿病遺伝子であるといえることができる。しかし、肥満症の項で述べた $\beta 3$ アドレナリンレセプターはNIDDMの強力な発症因子ではあるが、病因遺伝子であるとは言えない。あくまでこの因子は他の遺伝子とともに、環境因子の影響を受けながら肥満あるいはNIDDMの発症に関与しているものと思われる。

#### 【0007】

高血圧症の発症・進展に環境因子が関与することは広く知られているが、最近になって、遺伝性素因についても解明されるようになってきた。しかし、高血圧症の90%以上といわれる本態性高血圧症に関しては、発症に関連する遺伝因子が徐々にわかってきた程度で、病態全体を解明するためにはなお時間がかかる。

ヒト高血圧症の特徴として、多因子遺伝性、不完全浸透率、環境因子の影響が大きいことなどがあげられる。現在行われているヒト集団を用いた遺伝子解析の

手法としては、(1) 明らかに家族性の場合、家系構成員のDNAを用いて行う連鎖解析 (linkage analysis)、(2) 病気の兄弟、姉妹のDNAだけを用いて行う罹患同胞対法 (affected sub-pair method)、(3) 関連の検出 (association study) 法などがある。この中で、連鎖解析は遺伝的背景の強い特殊な形の高血圧症の原因遺伝子同定に威力を発揮し、罹患同胞対法や関連の検出法は、本態性高血圧症の遺伝危険因子解析に用いられている。

こうした中で、ほとんどの患者の原因として考えられる本態性高血圧症は、発症が遅いこともあり、3世代にわたってDNA採取することが難しく、大規模な連鎖解析は行われていない。このような状況で、最近非常に効果を上げているのが罹患同胞対法である。

1992年Jeunemaitreらは、アンジオテンシノーゲン遺伝子上に15カ所の変異を同定し、アメリカ、ユタ州とパリの罹患同胞対法（高血圧症の兄弟・姉妹）を用いて、エクソン2に存在するM235T（235番のコドンがMetからThrに変化する1塩基置換）変異と高血圧症とが優位に相関することを示した (Cell, 71, p169, 1992)。

この相関は、重症高血圧症においてより強く認められ、ACE/DD遺伝子多型と同様にTT遺伝子型のヒトのアンジオテンシノーゲン血中濃度を増加させる変異であることが明らかにされた。

AII1型レセプター遺伝子のpoint mutation (A1166C) が、高血圧と相関する報告 (Hypertension, 24, p63, 1994) や、AT1-R遺伝子knock-out mouseで血圧降下、AII2型レセプター遺伝子knock-out mouseで血圧上昇を認めたという報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, p3521, 1995; Nature, 377, p744, 1995) などより、AIIレセプター遺伝子も何らかの形で血圧調整に遺伝的に関与していることが示唆される。

さらに、Zeeらは低密度リポタンパク質レセプター遺伝子の異常が高血圧症患者の肥満に関係することを報告し (Biochem. Biophys. Res. Commun., 189, p965, 1992)、また、萩原らもSHRの体重にGJP (gap junction protein) 遺伝子座位が関与することを報告している (Hypertens. Res., 18, p63, 1995)。

このように高血圧症についての遺伝子レベルでの研究は着実に進んでいるが、

その本質的な病因因子を解明するためには、長期間にわたる大規模な遺伝免疫学も必要とされるので、まだかなりの時間は要するものと思われる。

【0008】

心臓疾病因子の遺伝子レベルの研究も盛んにおこなわれており、米国Brigham and Woman's Hospitalのグループは、心筋梗塞を抑制する2つの遺伝子と、リスクを高める遺伝子1つの染色体上での存在位置を特定したと報告している(Nature Genetics, 13, p429, 1996)。

遺伝性が高いと考えられる悪性腫瘍ではあるが、いわゆる常染色体性優性形式を示す遺伝性腫瘍は、一般的なガンに比較すると症例が限られており、染色体や遺伝子との関連が解明されているもので数十種類知られているだけである。

ガンの大多数は、単一遺伝子の変異に基づくMendel性遺伝形式に当てはまらない、あるいはその原因を遺伝子レベルで探ろうとした場合、候補遺伝子アプローチを採用することのできない疾病であると言える。しかしながら、このことは、一般的なガンが必ずしも孤発性、あるいは遺伝性ではないということを意味しているのではない。遺伝疫学的な研究からは特定のガン患者の近親者では類似した腫瘍が発生する危険性が高いことが知られている。すなわち、多因子遺伝学的な立場から、複数の環境因子や遺伝因子がガンを発症させるための条件になっていると考えるのが妥当である。

このように多因子遺伝モデルが適応されるガンではあるが、やはりガンは遺伝子の病気であり、発ガンはガン遺伝子やガン抑制遺伝子の異常が複数蓄積し、それが相乗的に多段階にわたって起こっていくことが明らかにされてきた。

大腸ガンについては、その多段階発生過程が詳細に研究されている。Rasなどのガン遺伝子の変異により、細胞の増殖が活発になり、またガン抑制遺伝子p53の異常で正常遺伝子の働きが不活性化され、細胞の増殖をコントロールできなくなっていくと考えられる。

また、最近前立腺肥大症から前立腺ガンへと細胞の悪性化を進行させる遺伝子として、PTI-1のクローニングに米国コロンビア大学のグループが成功した。PTI-1は良性な腺種を悪性腫瘍に変化させるスイッチの役割を果たしている。

本因子は翻訳プロセスを調整し、翻訳を異常化する遺伝子である。46kdのタン

パク質でポリペプチド鎖伸長因子EF1a(50kd)と相同性がある。PTI-1はEF1にポイントミューテーションと欠失が生じたものと考えられている。同グループの研究では、進行性前立腺ガン患者16人中、15人でPTI-1の発現を確認している。

【0009】

以上のように、各疾病の原因または危険因子の遺伝子発見の努力は、着実に成果を挙げているものの、疾病発症の全体像が明らかになるには、まだ多くの知見が必要である。

「疾患関連遺伝子の配列と機能の同定」の次のステップである「疾患発症原因遺伝子の決定、遺伝子情報の機能解析」は、その遺伝子の異常が疾病進行の結果生じたものか、それとも発症原因であるかを見極める重要な作業である。

しかし、前ステップでの知見（疾患関連遺伝子の発見）も、その実体は遺伝子配列情報にすぎず、ここから遺伝子の機能もしくは遺伝子産物の機能を正確に類推する方法は、現在のところほとんどない。

ノックアウト・トランスジェニックマウスの作成技術は、現在最も実現可能なアプローチとして挙げられるが、従来の技術レベルでは、遺伝子操作が生体に与えぬ重大な障害を及ぼす結果、死産もしくは出生直後の死亡により研究が進まない場合も多い。新たな進歩が将来蓄積していけば、ノックアウト・トランスジェニックマウスの作成技術は、遺伝子機能の解析に今後大きく貢献すると考えられる。

バイオインフォマティクスは、遺伝子の機能解明にポテンシャルを持つが、現状では基礎情報を整備している段階と考えられる。遺伝子配列の高速化はめざましく、ヒトcDNA配列はすでに相当なレベルまで解析されている。ここ数年は多くの困難を伴うと予測されるものの、多くの大学、ゲノムベンチャーにより遺伝子の機能解析が進むと予想される。これら基礎情報量の増加が相乗効果をもたらし、バイオインフォマティクスによる遺伝子の機能解析は、今後ある時を境に急激に進む可能性があり、遺伝子機能解析の手段として将来実力を発揮すると予想される。

疾患関連遺伝子の配列と機能を解析し、その結果、疾病原因遺伝子が特定された段階で、第三のステップとしてその情報をもとに新規医薬品の開発が始まる。

しかしその創薬技術については、確立されたものはない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

以上のような現状から、ヒト疾患関連構造遺伝子の解析から得られる遺伝子変異と疾病との因果関係を解明する情報に基づいて、新たな創薬技術の確立が望まれている。本発明は、このような新規医薬品創製法ならびにこれに基づいて調製される異常遺伝子産物作動物質の新規用途を提供するものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意検討した結果、ヒト細胞から調製したcDNAライブラリーあるいは市販のヒト細胞由来のcDNAライブラリーから異常遺伝子産物（異常受容体など）の遺伝子をクローニングし、この遺伝子により形質転換させた細胞を用いて、本発明を完成した。

本発明は、疾患の病態メカニズム・薬剤の作用機序などの発症結果からアプローチする従来の新薬開発とは異なり、発症の原因からの創薬アプローチを可能にさせる創薬技術に関し、本発明の創薬技術を用いることにより、従来とは全く異なる創薬アプローチの方向、すなわち「疾病原因からの創薬アプローチ」に基づいた新規医薬品の創製法が可能になる。特に、天然リガンドが低分子である脳・神経系に関わる疾患の治療薬の創製には重大なインパクトを与えるものである。

【0012】

さらに詳しくは、本発明は、

（1）異常遺伝子産物作動物質を含有してなる、該産物に起因する疾患の予防・治療剤；

（2）異常遺伝子産物が、異常受容体、異常チャンネル、異常トランスポーターまたは異常酵素である前記（1）記載の予防・治療剤；

（3）異常受容体作動物質を含有してなる、異常受容体に起因する疾患の予防・治療剤である前記（1）記載の予防・治療剤；

（4）異常受容体に起因する疾患が、異常受容体を有する細胞の伝達系が実質的に低下することに起因する疾患である前記（3）の予防・治療剤；

(5) 異常受容体に起因する疾患が、異常受容体を有する細胞の伝達系を天然リガンドが実質的に作動しないことに起因する疾患である前記(3)記載の予防・治療剤；

(6) 異常受容体に起因する疾患が、天然リガンドの異常受容体に対する親和性が実質的に低下することに起因する疾患である前記(3)記載の予防・治療剤；

(7) 伝達系が、天然リガンドと受容体との結合により生じる応答物質の細胞内濃度変化に基づく伝達系である前記(5)記載の予防・治療剤；

(8) 応答物質がcAMP、イノシトールリン酸またはカルシウムイオンである前記(7)記載の予防・治療剤；

(9) 異常受容体作動物質が、正常受容体を作動する物質である前記(3)記載の予防・治療剤；

(10) 異常受容体作動物質が、正常受容体を作動しない物質である前記(3)記載の予防・治療剤；

(11) 異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための、該産物作動物質の用途；

(12) 異常遺伝子産物が、異常受容体である前記(10)記載の用途；

(13) 異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング方法；

(14) 異常遺伝子産物が、異常受容体である前記(13)記載のスクリーニング方法；

(15) 異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための物質のスクリーニング方法；

(16) 異常受容体と被検物質とを接触させ、異常受容体に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の異常受容体を有する細胞の伝達系を実質的に作動させるための薬物のスクリーニング方法；

(17) 異常受容体が、異常受容体をコードする遺伝子を細胞で発現させること



により調製された異常受容体である前記（１５）記載のスクリーニング方法；

（１８）異常受容体をコードする遺伝子が、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の細胞から調製された遺伝子と、異常受容体を保持しない同種の哺乳動物の細胞から調製された遺伝子とを比較解析することにより特定された異常受容体をコードする遺伝子である前記（１７）記載のスクリーニング方法；

（１９）異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定し、異常遺伝子産物を実質的に作動すると判定される薬物を調製することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための薬物を調製する方法；

（２０）異常受容体と被検物質とを接触させ、異常受容体に対する該物質の作動性を検定し、異常受容体を有する細胞の伝達系を実質的に作動すると判定される物質を調製することを特徴とする、異常受容体に起因する疾患の治療のための物質を調製する方法；

（２１）異常受容体が、異常受容体をコードする遺伝子を細胞で発現させることにより調製された異常受容体である前記（２０）記載の方法；

（２２）異常受容体をコードする遺伝子が、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の細胞から調製された遺伝子と、異常受容体を保持しない同種の哺乳動物の細胞から調製された遺伝子とを比較解析することにより特定された異常受容体をコードする遺伝子である前記（２１）記載の方法；

（２３）異常遺伝子産物をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物に起因する疾患の治療のための物質をスクリーニングするための用途；

（２４）異常遺伝子産物が、異常受容体である前記（２３）記載の用途；

（２５）異常遺伝子産物をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物作動物質をスクリーニングするための用途；および

（２６）異常遺伝子産物が、異常受容体である前記（２５）記載の用途を提供するものである。

【００１３】

本明細書における「異常遺伝子産物」としては、例えば異常受容体、異常チャ

ンネル、異常トランスポーター、異常酵素などが挙げられる。上記した「異常」とは、遺伝子産物に対応する構造遺伝子の変異、なかでも生体内で自然発生した変異を示し、また、その結果、正常遺伝子産物を作動する物質（例えば、正常受容体を作動するリガンドであり、生体内に存在する天然リガンドなど）の反応性が正常遺伝子産物に対する該物質の反応性とは異なることに起因して疾患を引き起こしうる変異を示す。また、異常遺伝子産物と正常遺伝子産物との機能は同一であること、すなわち異常遺伝子産物に対する作動物質が異常遺伝子産物を作動した後においては、正常遺伝子産物に対する作動物質が正常遺伝子産物を作動した場合に生じるレスポンス（例えば、正常受容体を有する細胞の伝達系における応答物質の細胞内濃度変化など）と同様なレスポンスを示すことが好ましい。

異常遺伝子産物に起因する疾患としては、アルツハイマー病（例、家族性のアルツハイマー病、孤発性のアルツハイマー病など）、精神分裂病、うつ病、高血圧症（例、本態性高血圧症など）、肥満、糖尿病（例、インスリン非依存型糖尿病など）、心臓疾患（例、心筋梗塞など）、ガン（例、大腸ガン、前立腺ガンなど）、リウマチ、アレルギー性疾患（例、アトピーなど）、動脈硬化症などが挙げられるが、なかでも、アルツハイマー病、精神分裂病、うつ病、高血圧症、肥満、糖尿病、ガンなどが好ましい。

#### 【0014】

本明細書における「異常受容体」としては、受容体の構造遺伝子が生体内で変異した結果、天然リガンドの親和性が実質的に変化（例、低下、増強など；好ましくは低下）した受容体が挙げられ、なかでも、天然リガンドの親和性の実質的な変化に起因して疾患を引き起こす受容体が好ましい。ここで「実質的な変化」とは、正常受容体および異常受容体に対する天然リガンドの親和性を比較した場合において、疾患を引き起こしうる程度に変化していることを示し、有意な変化であっても、有意でない変化であっても、疾患を引き起こしうる変化であれば何れでもよい。また、異常受容体と正常受容体との機能は同一であること、すなわち異常受容体に対する作動物質が異常受容体を作動した後においては、正常受容体に対する天然リガンドが正常受容体を作動した場合に生じるレスポンス（例えば、正常受容体を有する細胞の伝達系における応答物質の細胞内濃度変化など）

と同様なレスポンスを示すことが好ましく、異常受容体を有する細胞の伝達系が正常受容体を有する細胞の伝達系と同一であることがさらに好ましい。すなわち、異常受容体を有する細胞が正常受容体を有する細胞と同一の伝達系を有しているにもかかわらず、受容体遺伝子の変異に起因して、天然リガンドの親和性が実質的に低下している場合には、異常受容体を有する細胞の伝達系が実質的に作動しないため、疾患を引き起こす原因となりうるが、異常受容体と結合し、異常受容体を有する細胞の伝達系を作動しうる異常受容体のアゴニストを用いれば、係る疾患を有効に予防または治療することが可能となる。

異常受容体に起因する疾患としては、天然リガンドの受容体に対する親和性が実質的に変化することに起因する疾患であれば何れでもよく、天然リガンドの受容体に対する親和性が実質的に低下することに起因する疾患、異常受容体を有する細胞の伝達系を天然リガンドが実質的に作動しないことに起因する疾患、異常受容体を有する細胞の伝達系が実質的に低下することに起因する疾患、異常受容体を有する細胞の伝達系における異常なシグナルあるいは過剰伝達に起因する疾患などが挙げられる。より具体的には、例えば、アルツハイマー病（例、家族性のアルツハイマー病、孤発性のアルツハイマー病など）、精神分裂病、うつ病、高血圧症（例、本態性高血圧症など）、肥満、糖尿病（例、インスリン非依存型糖尿病など）、心臓疾患（例、心筋梗塞など）、ガン（例、大腸ガン、前立腺ガンなど）、リウマチ、アレルギー性疾患（例、アトピーなど）、動脈硬化症などが挙げられるが、なかでも、アルツハイマー病、精神分裂病、うつ病、高血圧症、肥満、糖尿病、ガンなどが好ましい。

異常受容体作動物質としては、異常受容体のアゴニスト、異常受容体のアンタゴニストなどが挙げられる。これらは、対象となる疾患に応じて、適宜選択して用いられるが、例えば、天然リガンドの受容体に対する親和性が実質的に低下することに起因する疾患、異常受容体を有する細胞の伝達系を天然リガンドが実質的に作動しないことに起因する疾患、異常受容体を有する細胞の伝達系が実質的に低下することに起因する疾患などの疾患においては、異常受容体のアゴニストが好ましく用いられ、異常受容体を有する細胞の伝達系における異常なシグナルあるいは過剰伝達に起因する疾患などにおいては、異常受容体のアンタゴニスト

が好ましく用いられる。また、異常受容体作動物質は、正常受容体を作動する物質、正常受容体を作動しない物質の何れであってもよく、対象となる疾患に応じて、適宜選択して用いられるが、正常受容体を実質的に作動しない物質が好ましく用いられる。

上記した伝達系としては、天然リガンドと受容体との結合により生じる応答物質（例、cAMP、イノシトールリン酸、カルシウムイオンなど）の細胞内濃度変化に基づく伝達系などが挙げられる。

#### 【0015】

本明細書における「異常チャンネル」としては、チャンネルの構造遺伝子の変異した結果、正常チャンネルを作動する物質（例、ブロッカー、オープナーなど）の親和性が実質的に変化したチャンネルが挙げられ、なかでも、該作動物質の親和性の実質的な変化に起因して疾患を引き起こすチャンネルが好ましい。また、異常チャンネルと正常チャンネルとの機能は同一であること、すなわち異常チャンネルに対する作動物質が異常チャンネルを作動した後においては、正常チャンネルに対する作動物質が正常チャンネルを作動した場合に生じるレスポンス（例えば、ゲートの閉鎖または開放など）と同様なレスポンスを示すことが好ましい。異常チャンネルに起因する疾患としては、アルツハイマー病（例、家族性のアルツハイマー病、孤発性のアルツハイマー病など）、精神分裂病、うつ病、高血圧症（例、本態性高血圧症など）、肥満、糖尿病（例、インスリン非依存型糖尿病など）、心臓疾患（例、心筋梗塞など）、ガン（例、大腸ガン、前立腺ガンなど）、リウマチ、アレルギー性疾患（例、アトピーなど）、動脈硬化症などが挙げられるが、なかでも、アルツハイマー病、精神分裂病、うつ病、高血圧症、肥満、糖尿病、ガンなどが好ましい。

#### 【0016】

本明細書における「異常トランスポーター」としては、トランスポーターの構造遺伝子の変異した結果、正常トランスポーターを作動する物質（例、トランスポーターによる輸送を促進または阻害する物質など）の親和性が実質的に変化したトランスポーターが挙げられ、なかでも、該作動物質の親和性の実質的な変化に起因して疾患を引き起こすトランスポーターが好ましい。また、異常トランス

ポーターと正常トランスポーターとの機能は同一であること、すなわち異常トランスポーターに対する作動物質が異常トランスポーターを作動した後においては、正常トランスポーターに対する作動物質が正常トランスポーターを作動した場合に生じるレスポンス（例えば、イオン、栄養素などの輸送など）と同様なレスポンスを示すことが好ましい。

異常トランスポーターに起因する疾患としては、アルツハイマー病（例、家族性のアルツハイマー病、孤発性のアルツハイマー病など）、精神分裂病、うつ病、高血圧症（例、本態性高血圧症など）、肥満、糖尿病（例、インスリン非依存型糖尿病など）、心臓疾患（例、心筋梗塞など）、ガン（例、大腸ガン、前立腺ガンなど）、リウマチ、アレルギー性疾患（例、アトピーなど）、動脈硬化症などが挙げられるが、なかでも、アルツハイマー病、精神分裂病、うつ病、高血圧症、肥満、糖尿病、ガンなどが好ましい。

【0017】

本明細書における「異常酵素」としては、酵素の構造遺伝子に変異した結果、正常酵素を作動する物質（例、アクティベーター、インヒビターなど）の親和性が実質的に変化した酵素が挙げられ、なかでも、該作動物質の親和性の実質的な変化に起因して疾患を引き起こす酵素が好ましい。また、異常酵素と正常酵素との機能は同一であること、すなわち異常酵素に対する作動物質が異常酵素を作動した後においては、正常酵素に対する作動物質が正常酵素を作動した場合に生じるレスポンス（例えば、基質蛋白質の活性化など）と同様なレスポンスを示すことが好ましい。

異常酵素に起因する疾患としては、アルツハイマー病（例、家族性のアルツハイマー病、孤発性のアルツハイマー病など）、精神分裂病、うつ病、高血圧症（例、本態性高血圧症など）、肥満、糖尿病（例、インスリン非依存型糖尿病など）、心臓疾患（例、心筋梗塞など）、ガン（例、大腸ガン、前立腺ガンなど）、リウマチ、アレルギー性疾患（例、アトピーなど）、動脈硬化症などが挙げられるが、なかでも、アルツハイマー病、精神分裂病、うつ病、高血圧症、肥満、糖尿病、ガンなどが好ましい。

## 【0018】

異常遺伝子産物（例、異常受容体など）をコードする遺伝子を特定するためには、例えば、異常遺伝子産物に罹患した哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど、好ましくは、ヒト）の細胞から調製された遺伝子と、異常遺伝子産物を保持しない同種の哺乳動物の細胞から調製された遺伝子とを比較解析することによって、異常遺伝子産物をコードする遺伝子を調製し、特定することができる。

疾患関連遺伝子の配列と機能を解析し、その結果、疾患原因遺伝子として特定された異常遺伝子（例えば、ヒト細胞由来の異常遺伝子産物をコードする遺伝子など、好ましくはヒト細胞由来の異常受容体をコードする遺伝子など）は、例えば以下の方法により調製することができる。

まず、異常遺伝子産物をコードするRNAは、該遺伝子産物が由来する動物種の細胞（例、ヒト細胞など、好ましくは異常遺伝子産物に起因する疾患に罹患した動物の細胞）から調製される。これらの材料からRNAを調製する方法としては、グアニジン・チオシアネート法 [J. M. Chirgwin ら, バイオケミストリー (Biochemistry), 第18巻, 第5294頁 (1979年)] などが挙げられる。

このようにして得られたRNAにオリゴdTプライマーもしくはランダムオリゴヌクレオチドを添加した後、リバーズ・トランスクリプターゼを加えてcDNAを合成することができる。異常遺伝子産物の既報の配列または解析し特定された配列を基にして、得られたcDNA標品から該産物cDNAを増幅するためのセンスプライマーとアンチセンスプライマーを添加し、市販のキット（例えば、Cetus/Perkin-Elmer社製）のキットの指示書に従ってPCRを行うことができる。増幅されたcDNAを自体公知の方法、たとえばアガロース電気泳動で分離した後、ゲルから回収することができる。このcDNAの塩基配列はジデオキシヌクレオチド合成鎖停止法 [T. Messing ら, ヌクレイック・アッシズ・リサーチ (Nucl. Acids Res.), 第9巻, 第309頁 (1981年)] によって決定することができる。

クローン化されたcDNAを有するプラスミドはそのまま、あるいは所望により適当な制限酵素で切り出して別のベクターに挿入して用いることができる。

ベクターとしては、宿主に対応して複製できるものであれば何れでもよい。宿

主がエシェリキア属菌 (*Escherichia coli*, 大腸菌) の場合には、大腸菌由来のプラスミド、例えばpBR322 [F. Bolivar ら、*Gene*, 第2巻, 第95頁 (1979年)]、pBR325、pUC12、pUC13などが挙げられる。宿主が酵母である場合には、酵母由来プラスミド、例えばpSH19 [S. Harashima ら、*Molecular and Cellular Biology* (*Mol. Cell. Biol.*), 第4巻, 第771頁 (1984年)]、pSH19-1 (ヨーロッパ特許出願公開 EP-A-0235430) などが挙げられる。宿主が動物細胞の場合には、例えばpBR322にSV40のoriの挿入されたpSV2-X [R. C. Mulligan and P. Berg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*), 第78巻, 第2072頁 (1981年)]、pcD-X [H. Okayama and P. Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 第3巻, 第280頁 (1983年)] などが挙げられる。宿主が昆虫細胞の場合には、例えばバキュロウイルス・トランスファクター (*Baculovirus transfer vector*) pVL1392、pVL1393 [製造業者 (Invitrogen Corporation, CA, USA) のマニュアル (MAXBAC<sup>TM</sup> *Baculovirus expression system*, Manual version 1.4)] などが挙げられる。

#### 【0019】

クローン化されたcDNAは5'末端に翻訳開始コドン (ATG) を有し、また3'末端に翻訳終止コドン (TAG, TGAあるいはTAA) を有していてもよい。更に該cDNAを発現させるために、プロモーター配列を上流に接続するのが好ましい。

本発明に用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。宿主が大腸菌である場合には、T7プロモーター、trpプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーターなどが挙げられ、とりわけT7プロモーターが好ましい。宿主が酵母である場合には、GAPDHプロモーター、PGKプロモーター、PHO5プロモーター、ADHプロモーターなどが挙げられ、とりわけGAPDHプロモーターが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒトサイトメガロウイルスのプロモーターなどが挙げられる。宿主が昆虫細胞である場合、核多角体ウイルスのポリヘドリン (polyhedrin) プロモーターなどが挙げられる。

プロモーターは対応する遺伝子より調製することができる。また、化学合成することもできる。シグナル配列、プレープロ配列などを発現ベクターに含んでもよく、これらは宿主で機能するものであれば何れでもよい。

このようにして構築されたDNAを含有する組換え発現プラスミドを用いて、形質転換体を製造する。

# 【0020】

宿主としては、例えばエシェリキア属菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞などが挙げられる。エシェリキア属菌としては、エシェリキア・コリK12 DH1 [B. Low, P. roc. Natl. Acad. Sci. USA, 第60巻, 第160頁 (1968年)]、C600 [R. K. Apple yard, ジェネティクス (Genetics), 第39巻, 第440頁 (1954年)]、MM294 [K. Backmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第73巻, 第4174頁 (1976年)]、N4830 [M. E. Gottesman ら, ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 第140巻, 第57頁 (1980年)]などが挙げられる。酵母としては、例えばサッカロマイセス・セレビシェ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22 R<sup>-</sup> [A. Miyano-haraら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第80巻, 第1頁 (1983年)]、NA87-11A, DKD-5D, NA74-3A, NA74-3A ρ<sup>-</sup> [Y. Kaisho ら, イースト (Yeast), 第5巻, 第91頁 (1989年)] やシゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) ATCC38399 (h-leu1-32), TH168 (h9 0 ade6-M210 ural leu1) [M. Kishida and C. Shimada, カレント・ジェネティクス (Current Genetics), 第10巻, 第443頁 (1986年)]などが挙げられる。動物細胞としては、例えば付着細胞であるサルCOS-7細胞、サルVero細胞、チャイニーズ・ハムスター卵巣 (CHO) 細胞、マウスL細胞、ヒトFL細胞、及び浮遊細胞であるマウスミエローマ細胞 (Sp2/0細胞など)、マウスYAC-1細胞、マウスMethA細胞、マウスP388細胞、マウスEL-4細胞などが挙げられる。昆虫細胞としては、Sf9細胞などが挙げられる。

エシェリキア属菌を形質転換するには、例えば T. Maniatis ら [モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning), コールド・スプリング・ハーバー研究所 (Cold Spring Harbor Laboratory), 第249頁 (1982年)] が記載した方法に従って行われる。酵母を形質転換するには、例えば A. Hinnen ら [Proc. Nat



1. Acad. Sci. USA, 第75巻, 第1929頁 (1978年) ] が記載した方法に従って行われる。動物細胞を形質転換するには、例えば M. Wigler ら, Cell, 第14巻, 第725頁 (1978年) に記載の方法に従って行われる。昆虫細胞を形質転換するには、製造業者 (Invitrogen Corporation) のマニュアル (MAXBAC<sup>TM</sup> Baculovirus expression system, Manual version 1.4) に従って行われる。

このようにして得られた形質転換体をそれ自体公知の方法で培養する。

【0021】

宿主がエシェリキア属菌である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [J. H. Miller, エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Experiments in Molecular Genetics), 第431頁, Cold Spring Harbor Laboratory, (1972年) ] が好ましい。ここに必要なによりプロモーターを効率よく働かせるために、例えばイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) やインドリル-3-アクリル酸のような薬剤を加えることができる。培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪はんを加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [K. L. Bostain ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 第77巻, 第4504頁 (1980年) ] などが挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪はんを加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば約5~20%の牛胎仔血清を含むMEM培地 [H. Eagle, サイエンス (Science), 第130巻, 第432頁 (1959年) ]、DMEM培地 [R. Dulbecco and G. Freeman, ヴィロロジー (Virology), 第8巻, 第396頁 (1959年) ]、RPMI-1640培地 [G. E. More ら, ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (J. Am. Med. Assoc.), 第199巻, 第519頁 (1967年) ]、199培地 [J. F. Morgan ら, プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・エクスペリメンタル・バイオロジー・アンド・メディスン (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.), 第73巻, 第1頁 (1950年) ]、ASF104培地 [味の素 (株) ] などが挙げられる。培養は通常約30

～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪はんを加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えばTNM-FH培地[W. F. Hinkら, Nature, 第226巻, 第466頁(1990年)]などが挙げられる。培養は通常約15～30℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪はんを加える。 【0022】

本発明によれば、上記培養物から発現産物(異常受容体などの異常遺伝子産物)を単離するには、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティクロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

本発明によって、異常遺伝子産物を大腸菌、動物培養細胞、昆虫培養細胞などを用いて遺伝子工学的に発現させることによって、高純度で、大量に製造することが可能となった。

#### 【0023】

かくして得られる異常遺伝子産物が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

また、異常遺伝子産物(例、ヒトなどの異常受容体など)のcDNAを用いて真核細胞を用いて発現させ、得られた異常遺伝子産物を用いて、それを作動する化合物を探索するのに用いることができ、あるいは、特定された異常遺伝子産物をコードする遺伝子をDNAプローブとして用いることにより、生体内に発現している異常遺伝子産物のmRNAの含量をノーザンブロッティング法により測定することができる。さらに、該異常遺伝子産物に対する抗体を作製し、生体内における該産物をin situハイブリダイゼーションによって測定することもできる。

この異常遺伝子産物は、異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための薬物のスクリーニング（例、異常受容体に起因する疾患に罹患した哺乳動物の異常受容体を有する細胞の伝達系を作動させるための薬物のスクリーニングなど）などに用いることができ、特に、ヒトなどの温血動物において、疾患に関連した異常受容体のアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするのに有用である。

## 【0024】

上記したスクリーニングについて、以下により具体的に説明する。

上記異常遺伝子産物は、その作動物質を探索するのに有用である。すなわち、該産物と被験物質とを接触させることを特徴とする異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング方法の提供を可能にする。

被験化合物としては、公知のリガンド、合成化合物、ペプチド、蛋白質などの他に、例えば温血哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを上記異常遺伝子産物に添加し、作動活性などを検定しながら分画し、最終的に単一の作動物質を得ることができる。

具体的には、単離された異常遺伝子産物を用いるか、または異常遺伝子産物（例、異常受容体など）の発現系を構築し、該発現系を用いることによって、該産物の作動活性を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）を決定する方法が挙げられる。特に、異常受容体の作動物質をスクリーニングする場合には、異常受容体をコードする遺伝子を細胞で発現させることにより調製された異常受容体を用いるのが好ましい。

## 【0025】

より具体的には、本発明は、

- ① 標識した被験物質を、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）に接触させた場合における、標識した該物質の該産物に対する結合量を測定すること、
- ② 標識した被験物質を、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した被験物質の該細胞または該膜面分に対する結合量を測定すること、

③標識した被験物質を、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した該産物に接触させた場合における、標識した被験物質の該産物に対する結合量を測定すること、

④被験物質を、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）を含有する細胞に接触させた場合における、該産物を介した活性（例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など）を測定し、該物質の作動性を検定すること、および

⑤被験物質を、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した異常遺伝子産物に接触させた場合における、異常遺伝子産物を介する活性（例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など）を測定し、該物質の作動性を検定することなど、または必要に応じて適宜これらを組み合わせることを特徴とする異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング方法を提供する。

標識した被験物質としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{135}\text{S}]$ などで標識した物質が挙げられる。

#### 【0026】

異常受容体作動物質をスクリーニングするための具体例を以下に説明する。

まず、異常受容体を含有する細胞または細胞の膜面分を、適当なバッファーに懸濁することにより異常受容体標品を調製する。バッファーには、pH4~10（望ましくはpH6~8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどが用いられるが、被験物質と異常受容体との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80（商品名）（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる受容体や被験物質の分解を抑える目的でPMSF（フェニルメタンスルホニルフルオリド）、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該受容体溶液に、一定量（5000cpm~500000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[$

<sup>14</sup>C)などで標識した被験物質を共存させる。非特異的結合量 (NSB)を知るために大過剰の未標識の被験物質を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量 (B) から非特異的結合 (NSB) を引いたカウント (B-NSB) が0cpmを越える被験物質を異常受容体に対するリガンドとして選択することができる。

## 【0027】

異常受容体に対する被験物質の作動性を検定するためには、まず、異常受容体を含む細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、被験物質などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。被験物質と異常受容体を含む細胞とを接触させた場合における、該産物を介した活性（例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など）あるいはcAMP、イノシトールリン酸、カルシウムイオンなどの細胞内伝達系における応答物質の濃度変化などを測定することにより、または被験物質と異常受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した異常受容体に接触させた場合における、異常遺伝子産物を介する活性（例えば、増殖促進、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進あるいは抑制する活性など）あるいはcAMP、イノシトールリン酸、カルシウムイオンなどの細胞内伝達系における応答物質の濃度変化などを測定し、該物質の作動性を検定することができる。

## 【0028】

また、本発明は、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）と被験物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定し、異常遺伝子産物を実質的に作動

すると判定される薬物を調製することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための薬物を調製する方法、異常受容体と被検物質とを接触させ、異常受容体に対する該物質の作動性を検定し、異常受容体を有する細胞の伝達系を実質的に作動すると判定される物質を調製することを特徴とする、異常受容体に起因する疾患の治療のための物質を調製する方法など、すなわち、ヒト疾患関連構造遺伝子の解析から得られる遺伝子変異と疾病との因果関係を解明する情報に基づいて、確立された新規医薬品創製法ないしは調製法を提供するものである。このように調製された薬物は、異常遺伝子産物に起因する疾患の予防・治療剤として用いるために、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。また、例えば、生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって、目的とする予防・治療剤を製造することができる。

#### 【0029】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール

）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート80（商品名）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は低用量でも効果を奏するため安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。投与量は、対象となる疾患やその症状などにより差異はあるが、高血圧症の治療剤として経口投与する場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

#### 【0030】

さらに本発明は、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）に起因する疾患の治療のための、該産物作動物質の用途、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物に起因する疾患の治療のための物質をスクリーニングするための用途、異常遺伝子産物（例、異常受容体など）をコードする遺伝子を細胞で発現させて得られる異常遺伝子産物の、該産物作動物質をスクリーニングするための用途などをも提供するものである。

## 【0031】

## 【発明の実施の形態】

本願明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commision on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次に挙げる。またアミノ酸に関して光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
Gly	: グリシン (G)
Ala	: アラニン (A)
Val	: バリン (V)
Leu	: ロイシン (L)
Ile	: イソロイシン (I)
Ser	: セリン (S)
Thr	: スレオニン (T)
Cys	: システイン (C)
1/2 Cys	: ハーフシスチン
Met	: メチオニン (M)
Glu	: グルタミン酸 (E)
Asp	: アスパラギン酸 (D)
Lys	: リジン (K)
Arg	: アルギニン (R)
His	: ヒスチジン (H)
Phe	: フェニールアラニン (F)
Tyr	: チロシン (Y)



Trp : トリプトファン (W)  
 Pro : プロリン (P)  
 Asn : アスパラギン (N)  
 Gln : グルタミン (Q)  
 Apr : アンピシリン耐性遺伝子  
 Tcr : テトラサイクリン耐性遺伝子

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳しく説明するが、これらは単なる例であって、本発明を何ら限定するものではない。

【0032】

実施例1 ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体の cDNA クローニング

PCR法によってヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体 cDNA を増幅させるため、既報のヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体の塩基配列 [J.M. Lelias ら, フェブス・レターズ (FEBS Lett.), 第324巻, 第127頁 (1993年)] を参考にして以下に示す2種類 (NO. 1 と NO. 2) のプライマーを合成した。

センス・プライマー No. 1 :

5'-ATTTGGGAGACCCCTCCTTCCTTCTTCC-3'

(配列番号 : 1)

アンチセンス・プライマー No. 2 :

5'-ACAGAGTTGTTGCTTCTTGTCTTCAGGCC-3'

(配列番号 : 2)

TaKaRa Ex Taq [宝酒造(株)] および添付のバッファーを用い、以下のPCR反応を行った。ヒト脂肪細胞由来cDNA ライブラリー (CLONTECH Laboratories, Inc.) 0.5  $\mu$ l を鋳型に添付のPCR反応バッファー (10 倍濃度) 5  $\mu$ l、dNTP混合液 4  $\mu$ l、TaKaRa Ex Taq 0.5  $\mu$ l (2.5U)、2種類のプライマー (上記 No. 1 と  $\lambda$ gt 11 フォワード・プライマー [宝酒造(株)] および上記 No. 1 と  $\lambda$ gt 11 リバース・プライマー [宝酒造(株)] の組み合わせ; 各 100pmol) を各々、別々のチューブに添加し、滅菌蒸留水で 50  $\mu$ l とした。94℃、2 分間、61℃、1 分間、72℃、1 分間の PCR 反応を各々 25 回繰り返し、2 本を混合し、さらに、その混合反応液 5  $\mu$ l に 2 種類のプライマー (上記 No. 1 と No. 2 ; 各 100pmol) を添加し、94℃、

2分間、55℃、1分間、72℃、1分間のPCR反応を30回繰り返した。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動で分離したところ、ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体の塩基配列から予想される大きさ(1310bp)に相当する位置に増幅されたDNA断片を確認した。このDNA断片をアガロースゲルから回収し、プラスミド・ベクターpUC19 [宝酒造(株)] のSmaI部位に挿入し、p19-h $\beta$ 3Rを作製した。cDNA部分の塩基配列をジデオキシヌクレオチド合成鎖停止法 [J. Messingら、ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acid Res.)、第9巻、第309頁(1981年)] により決定し、既報の配列と同一のものであることを確認した。

## 【0033】

実施例2 ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体の変異(Trp64Arg)DNAの作製

変異導入用合成オリゴヌクレオチドを合成し、Mutan-Super Express Km [宝酒造(株)] を用いて以下のように行った。

変異導入用合成オリゴヌクレオチド No. 3 :

5'-TGGCCATCGCCCGGACTCCGAG-3'

(配列番号 : 3)

実施例1に記載のプラスミドp19-h $\beta$ 3Rを制限酵素EcoRIとXbaIで消化して得られたDNA断片をアガロースゲルから回収し、キット添付のプラスミドベクターpKF18k [宝酒造(株)] のEcoRIとXbaI部位に挿入し、p18k-h $\beta$ 3Rを作製した。このDNAの10ngを鋳型に添付のセレクションプライマー5pmolと上記No.5プライマー5pmol、反応バッファー(10倍濃度)5 $\mu$ l、dNTP混合液4 $\mu$ l、TaKaRa LA Taq 0.5 $\mu$ l(2.5U)を添加し、滅菌蒸留水で50 $\mu$ lとし、94℃、1分間、55℃、1分間、72℃、3分間のPCR反応を25回繰り返して行った後、エタノール沈澱によってDNAを回収した。このDNAを5 $\mu$ lの滅菌蒸留水に溶解し、2 $\mu$ lを使用して添付の大腸菌MV1184株に導入し、カナマイシン含有(50 $\mu$ g/ml)LBプレートで生育する形質転換体を得た。これらの形質転換体のうち数クローンについて変異部位の塩基配列を決定し、変異の導入を確認したクローンをp18k-h $\beta$ 3(W64R)Rと命名した。

## 【0034】

実施例3 ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体遺伝子を動物細胞で発現させるための組

## 換えDNAの作製

実施例 1 に記載のプラスミド p19-h $\beta$  3R を EcoRI と XbaI で消化した後、ヒト  $\beta$  3 アドレナリン受容体 cDNA の断片をアガロースゲルから回収した。次に、動物細胞における一過性発現用のベクター pME18S [R. Sasada ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.)、第 190 巻、第 1173 頁 (1993 年)] の EcoRI と XbaI 部位に、上述の cDNA 断片を挿入し、発現プラスミド ph $\beta$  3R201 を作製した。次に、安定発現株選択のために、薬剤耐性マーカーであるネオマイシン耐性遺伝子 (neo) を以下のように組み込んだ。まず、プラスミド ph $\beta$  3R201 の KpnI 部位と SspI 部位の間に、SV40 初期プロモーターと neo 遺伝子、SV40 ポリ A 付加シグナルから成る断片を挿入し、プラスミド ph $\beta$  3R203 を作製した。

実施例 2 に記載のプラスミド p18k-h $\beta$  3(W64R)R を EcoRI と XbaI で消化した後、ヒト  $\beta$  3 アドレナリン受容体変異 cDNA の断片をアガロースゲルから回収した。上述の方法と同様に行い、プラスミド ph $\beta$  3(W64R)R201 および ph $\beta$  3(W64R)R203 を作製した。

## 【0035】

### 実施例 4 ヒト $\beta$ 3 アドレナリン受容体遺伝子の動物細胞における発現

実施例 3 記載のプラスミド (ph $\beta$  3R203 および ph $\beta$  3(W64R)R203) の CHO 細胞 (チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞) への遺伝子導入を Mammalian Transfection Kit (STRATAGENE, CA, USA) を用いて以下のように行った。

80cm<sup>2</sup> フラスコに完全培地 [10%(v/v) FCS (牛胎児血清) を含む ハム F-12 培地 (LIFE TECHNOLOGIES, INC.)] 15ml を添加し、CHO 細胞を  $5 \times 10^5$  個播種した。この培養液を 5% の二酸化炭素存在下、37℃ で一夜培養した後、10ml の上記培地と交換した。実施例 1 に記載のプラスミド (ph $\beta$  3R203) 30  $\mu$ g に滅菌水を加えて 450ml とし、上記キット中の solution #1 を 50  $\mu$ l 加え、さらに solution #2 を 500  $\mu$ l 添加し混合した。室温で 15 分間放置後、この混合液 1ml を細胞上に滴下して混合し、3% の二酸化炭素存在下、37℃ で一夜培養した。翌日、培地を除き、F-12 培地 (無血清) で細胞表面を洗った後、完全培地 (10% FCS/F-12) 15ml を添加して 5% の二酸化炭素存在下、37℃ で一夜培養した。翌日、10% FCS を含む D-MEM/F-12 培地 [日

研生物医学研究所(株)] を分注(1 ml/ウエル)した12穴プレートに1 ウエルあたり約200個の上記細胞を播種し、一夜培養後、G418(LIFE TECHNOLOGIES, INC.)を400  $\mu$ g/ml含む培地(10%FCS/D-MEM/F-12)で3日から4日毎に培地交換をしながら、コロニー形成が認められるまで培養した。コロニー形成が多数認められた後、400  $\mu$ g/mlのG418を含む10%FCS/D-MEM/F-12培地を分注(2 ml/ウエル)した24穴プレートに1 ウエルあたり1 から数個のコロニーを播種培養し、G418耐性細胞を取得した(1次クローニング)。次に、1次クローニングの細胞のうち2から3ウエルの細胞についてG418の濃度を800  $\mu$ g/mlに上げて24穴プレートに1 ウエルあたり10個のコロニーを播種培養し、G418耐性細胞を取得した。これらの細胞から、下記の実施例5に示す方法によってヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体高発現株を選択した(2次クローニング)。

#### 【0036】

#### 実施例5 ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体発現細胞のcAMP活性測定

cAMP活性測定はcAMP ELA SYSTEM(Amersham, UK)を用いて以下のように行った。

実施例4で得られた24穴プレート上のヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体発現細胞(CH0/ph $\beta$ 3R203 およびCH0/ph $\beta$ 3(W64R)R203)の培養液をG418を含まない培地(10%FCS/D-MEM/F-12)に交換し、0.5mM IBMX [3-isobutyl-1-methylxanthine; 和光純薬(株)] を添加した。5%の二酸化炭素存在下、37℃で30分間培養後、10-5 M イソプロテレノール [(±)-isoproterenol; フナコシ(株)] を添加し、さらに30分間培養した。次に、細胞表面を4℃のPBS(リン酸緩衝液)で3回洗い、0.1N塩酸を300  $\mu$ l添加し、95℃で10分間煮沸した。各ウエルから25  $\mu$ lを分取し、キット添付のassay buffer 75  $\mu$ lに溶解した。この溶解液から50  $\mu$ lを分取し、キット添付の抗ウサギIgGロバ抗体固相化96穴マイクロタイタープレートの各ウエルに抗cAMPウサギ抗体100  $\mu$ lとともに分注し、4℃で1時間放置した。次に、HRP標識cAMPを100  $\mu$ l添加し、さらに4℃で1時間放置後、各ウエルを4回洗浄し、TMB(3,3,5,5-tetramethylbenzidine)を150  $\mu$ l添加し、室温で60分間放置後、各ウエルに1 N硫酸を100  $\mu$ l添加して450nmの波長で吸光度を測定した。 $\beta$ アドレナリン受容体の作動薬であるイソプロテレノールによってcAMP活性が上昇する細胞株を選択

した。

# 【0037】

## 実施例6 変異型ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体の結合活性の測定

Trp64Arg変異型ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体を発現させたチャイニーズ・ハムスターの卵巣由来細胞株であるCHO細胞を作製し、Trp64Arg変異型 $\beta$ 3アドレナリン受容体特異的に結合する化合物を探索した。Trp64Arg変異型 $\beta$ 3アドレナリン受容体を発現させたCHO細胞を氷冷したリン酸緩衝液で3回洗浄後、氷冷した低張液(1mM トリス塩酸緩衝液、pH7.2)に10分間浸し、細胞を剥離回収した後、4℃で15分間18000rpmで遠心分離して該受容体を含有する細胞膜画分を回収した。得られた細胞膜画分にTME緩衝液(75mM トリス塩酸緩衝液、pH7.4、12.5mM 塩化マグネシウム、1.5mM EDTA、4 $\mu$ Mデシプラミン、5 $\mu$ g/mlロイペプチン、1 $\mu$ g/mlベンザミジン、5 $\mu$ g/mlトリプシン阻害剤 および40 $\mu$ g/mlバシトラシン)を加え、25ゲージの注射針を用いて均一に懸濁し受容体標品とした。調製した受容体標品(蛋白質として10-30 $\mu$ g含有)と $[^{125}\text{I}]$ -ヨードシアノピンドロール(240pM、DuPont-NEN、USA)および化合物を混合し、最終的に250 $\mu$ lになるようTME緩衝液で容量を調節し、室温にて90分間静置した。グラスファイバーフィルター(GF/B、Packard Instrument Co., Inc., USA)およびセルハーベスター(Filter Mate Cell Harvester、Packard Instrument Co., Inc. USA)を用いて吸引濾過し、フィルターの放射活性をシンチレーションカウンター(TopCount Microplate Scintillation Counter、Packard Instrument Co., Inc. USA)を用いて測定した。非特異的結合は、(S)-(-)-プロプラノロール(Sigma、USA)を終濃度100 $\mu$ M添加することにより求めた。

# 【0038】

## 実施例7 変異型ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体発現CHO細胞におけるcAMP上昇活性の測定

Trp64Arg変異型ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体を発現させたチャイニーズ・ハムスターの卵巣由来細胞株であるCHO細胞を96ウェルマイクロタイタープレートに播種し( $1 \times 10^4$ 細胞/ウェル)、コンフルエントに達してから72時間培養後に被験化合物を添加し、40分間、37℃で静置した(100 $\mu$ l/ウェル)。細胞を4℃のリン酸緩

衝液で3回洗浄後、0.1N塩酸を添加し、95℃で10分間煮沸した。各ウェルから25  $\mu$ lを採取し、cAMP EIA SYSTEM (Amersham, UK) 付属のアッセイ緩衝液75  $\mu$ lに溶解し、そのうちの50  $\mu$ lをサンプルとして上記cAMP EIA SYSTEMを用いて定量した。方法は以下のとおりである。抗ウサギIgGロバ抗体固相化96ウェルマイクロタイタープレートに上記のサンプル(50  $\mu$ l)および抗cAMPウサギ抗体を100  $\mu$ l添加し、4℃で2時間静置し、更にホース・ラディッシュ・パーオキシダーゼ(HRP)標識cAMPを100  $\mu$ l添加し、4℃で1時間静置した。各ウェルを吸引した後、洗浄液で4回洗浄(400  $\mu$ l/ウェル)した。次に、各ウェルにHRPの基質であるテトラメチルベンチジンを150  $\mu$ l添加し、室温で振盪しながら60分間インキュベーションした。最後に各ウェルに1.0N硫酸を100  $\mu$ l添加して反応を終了させた後、波長450nmで吸光度を測定することによりcAMP量を定量した。その結果、CHO細胞内のcAMP濃度が添加した化合物の濃度に依存して増加し、その増加は化合物未添加の場合に比較して有意であった。

## 【0039】

## 実施例8 化合物の探索

実施例6の方法に従い化合物の探索を行った結果、Trp64Arg変異型ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体に親和性の高い化合物が見い出された。該化合物を実施例7の方法に従って実験を行った結果、その添加濃度に応じてTrp64Arg変異型ヒト $\beta$ 3アドレナリン受容体を発現させたCHO細胞内のcAMP濃度を上昇させることが見い出された。

## 【0040】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：センス

配列：

ACAGAGTTGT TGCTTCTTGT CCTTCAGGCC

【0041】

配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：アンチセンス

配列：

ACAGAGTTGT TGCTTCTTGT CCTTCAGGCC

【0042】

配列番号：3

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：センス

配列：

TGGCCATCGC CCGGACTCCG AG

【書類名】要約書

【要約】

【課題】疾患に関連する構造遺伝子の解析から得られる情報、遺伝子変異と疾患との因果関係を解明する情報などを用いることにより、疾患原因からの創薬アプローチを可能にさせる新規創薬技術およびこの新規医薬品創製法に基づいて調製される異常遺伝子産物作動物質の用途を提供する。

【解決手段】（１）異常遺伝子産物作動物質を含有してなる、該産物に起因する疾患の予防・治療剤；（２）異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための、該産物作動物質の用途；（３）異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定することを特徴とする、異常遺伝子産物作動物質のスクリーニング方法；および（４）異常遺伝子産物と被検物質とを接触させ、該産物に対する該物質の作動性を検定し、異常遺伝子産物を実質的に作動すると判定される薬物を調製することを特徴とする、異常遺伝子産物に起因する疾患の治療のための薬物を調製する方法。

【選択図】なし



【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 000002934  
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号  
【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100073955  
【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号  
武田薬品工業株式会社大阪工場内  
【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100077012  
【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 武田  
薬品工業株式会社内  
【氏名又は名称】 岩谷 龍

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

氏 名 武田薬品工業株式会社